

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.01.008
文章编号: 1005-8982 (2024) 01-0050-07

实验研究·论著

穿心莲内酯靶向Akt信号干预HIV感染T细胞的效率研究*

张雅靖¹, 鲁世金², 魏训东³, 朱其凤², 马洁²

[1.广西中医药大学 研究生院, 广西 南宁 530000; 2.广西中医药大学附属瑞康医院 中西医结合转化医学中心, 广西 南宁 530000; 3.北京医院生物治疗中心 (国家老年医学中心/中国医学科学院老年医学研究院), 北京 100730]

摘要: **目的** 探讨穿心莲内酯靶向Akt信号干预人类免疫缺陷病毒(HIV)感染T细胞的效率。**方法** 培养Jurkat T细胞, 用WST-1试剂检测穿心莲内酯干预对Jurkat T细胞活性的影响。将Jurkat T细胞分为空白对照组、穿心莲内酯组、LY294002组 (PI3K抑制剂) 及穿心莲内酯联合LY294002组。各组药物分别干预24 h后, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组细胞PI3K、Akt mRNA相对表达量, 采用Western blotting检测各组细胞p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白相对表达量。制备HIV假病毒, 用假病毒感染各组细胞, 荧光素酶系统检测假病毒感染Jurkat T细胞的效率。**结果** WST-1试剂检测结果显示, 随着穿心莲内酯浓度增加, Jurkat T细胞活力降低($P < 0.05$)。qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, 穿心莲内酯降低Jurkat T细胞PI3K及其下游Akt mRNA相对表达量及p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白相对表达量 ($P < 0.05$)。HIV假病毒感染实验结果显示, 穿心莲内酯降低HIV假病毒感染Jurkat T细胞的效率, 联合组比单独组的抑制效果更好 ($P < 0.05$)。**结论** 穿心莲内酯可能通过PI3K降低其下游Akt的活化, 从而减少HIV假病毒在Jurkat T细胞间的传播及进入细胞的机会, 降低其感染Jurkat T细胞的概率。

关键词: 艾滋病; 穿心莲内酯; 人类免疫缺陷假病毒; PI3K; Akt
中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A

Exploring the efficiency of andrographolide targeting Akt signal to interfere with HIV-infected T cells*

Zhang Ya-jing¹, Lu Shi-jin², Wei Xun-dong³, Zhu Qi-feng², Ma Jie²

[1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530000, China;
2. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Translational Medicine Center, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530000, China;
3. Biotherapy Center, Beijing Hospital (National Center for Geriatrics/Institute of Geriatrics, Chinese Academy of Medical Sciences, P.R.China), Beijing 100730, China]

Abstract: Objective This study aims to investigate the efficiency of puerarin targeting the Akt signaling pathway in intervening with Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection in T cells. **Methods** Jurkat T cells were cultured, and the impact of puerarin intervention on Jurkat T cell activity was assessed using WST-1 reagent. Jurkat T cells were divided into a blank control group, puerarin group, LY294002 group (PI3K inhibitor), and a

收稿日期: 2023-03-26

* 基金项目: 广西科技基地和人才专项项目(No:2021AC18006, No:2021AC19393); 广西研究生教育创新计划项目(No: YCXJ2021093)
[通信作者] 马洁, E-mail: majie4685@bjhmoh.cn

combined puerarin-LY294002 group. After 24 hours of drug intervention, real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to measure the relative expression of PI3K and Akt mRNA in each group, and Western blotting was used to detect the relative expression of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt proteins. HIV pseudovirus was prepared to infect cells in each group, and the efficiency of pseudovirus infection in Jurkat T cells was assessed using a luciferase system. **Results** WST-1 assay results revealed a dose-dependent reduction in Jurkat T cell viability with increasing concentrations of puerarin ($P < 0.05$). qRT-PCR and Western blotting results indicated that puerarin decreased the relative expression of PI3K and downstream Akt mRNA, as well as p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt proteins in Jurkat T cells ($P < 0.05$). Results from the HIV pseudovirus infection experiment demonstrated that puerarin reduced the efficiency of HIV pseudovirus infection in Jurkat T cells, with the combined treatment showing superior inhibitory effects compared to the individual treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Puerarin may reduce the activation of Akt downstream of PI3K, thereby decreasing the opportunity for HIV pseudovirus spread and entry into Jurkat T cells, ultimately lowering the probability of infection.

Keywords: acquired immunodeficiency syndrome; andrographolide; human immunodeficiency pseudovirus; phosphoinositide 3-kinase; protein kinase b

艾滋病是一种由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 引起的免疫功能缺陷的传染性疾病, 是通过从非人灵长类动物到人类的猿免疫缺陷病毒的多次跨物种传播引入的^[1]。艾滋病大流行已经持续了 40 年, 其间至少有 3 200 万人因此病丧生^[2]。据联合国艾滋病规划署统计, 截至 2021 年, 有 3 840 万人是艾滋病毒感染者, 其中 3 670 万人年龄 ≥ 15 岁, 170 万人年龄 < 15 岁。人类一直在与艾滋病做抗争, 试图寻找能够彻底治愈艾滋病的治疗方法。目前, 治疗艾滋病最有效的方法是高效抗逆转录病毒治疗。随着抗逆转录病毒治疗的推广和使用, 艾滋病毒感染者的寿命接近普通人群的寿命, 病死率大幅度下降。然而, 此治疗方法不能彻底治愈艾滋病, 并且可能给数百万抗逆转录病毒药物依赖者带来不良症状和副作用^[3], 因此, 寻找新的药物和治疗方法非常有必要。中医药介入治疗在一定程度上可以缓解一些临床症状和西药治疗带来的毒副作用, 调节免疫功能, 且毒副作用较小。

现代药理学研究发现, 中药穿心莲有解热、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节免疫、抗心律失常等药理作用^[4], 其有效成分穿心莲内酯有抗 HIV 的潜在作用, 但其抗 HIV 的具体机制仍不清楚^[5]。近年来有文章报道, PI3K/Akt 信号通路可能参与 HIV 感染靶细胞的过程^[6-7], Akt 的激活可能促进病毒在细胞间的传播^[8]。另有部分动物实验和体外研究发现, 穿心莲内酯可能对 PI3K/Akt 信号通路有抑制作用^[9-12]。因此, 本研究假设穿心莲内酯可能通过抑制 Jurkat T 细胞内 PI3K 的表达, 抑制其下游 Akt 的激活, 降低

HIV 假病毒在细胞间的传播及感染细胞的效率, 实验目的和意义在于为后续艾滋病的深入研究及穿心莲的药用价值的开发利用提供相应参考信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Jurkat T 细胞 (人白血病 T 淋巴细胞)、293T 细胞均为本实验室提供, 胎牛血清购自澳大利亚 Ausgene X 公司, RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基购自美国 Invitrogen Gibco 公司, 二甲基亚砜 (DMSO)、PBS、RIPA 裂解液 (含 PMSF)、5%BSA 封闭液均购自北京索莱宝科技有限公司, 台盼蓝染色剂 (0.4%)、预染蛋白分子量标准均购自美国赛默飞世尔科技公司, β -巯基乙醇、穿心莲内酯均购自上海麦克林生化科技股份有限公司, WST-1 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, HiScript III All-in-one RT Super Mix Perfect for qPCR、通用型高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, PVDF 膜购自安徽兰杰柯科技有限公司, PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、GAPDH 兔抗一抗以及羊抗兔二抗购自江苏亲科生物研究中心有限公司, 荧光素酶检测系统试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 实验仪器

细胞培养箱 (CLM-170B-8-NF, 江苏太仓艺斯高医疗器械科技有限公司), 生物显微镜 (CKX53, 日本奥林巴斯公司), 生物安全柜 (LA2-4A1, 青岛海尔

特种电器有限公司),实验室冷藏箱(HLR-310F,青岛海尔特种电器有限公司),高速离心机(VELOCITY,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),医用离心机(TD5A-WS,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),电子天平(PRACTUM224-1CN,德国赛多利斯公司),全自动高温高压灭菌器(MLS-3751L-PC,上海申安医疗器械厂),恒温水浴锅(HH-6,常州国华科技发展有限公司),紫外可见分光光度计[BioSpec-nano,岛津企业管理(中国)有限公司],多功能微孔板检测仪(infinite 200PRO,瑞士帝肯公司),PCR仪(CFX Connect,上海柏辰生物科技有限公司),电泳槽[WIX-midiDNA,韦克斯科技(北京)有限公司],全自动化学发光图像分析系统(ChemiScope 6100,上海勤翔科学仪器有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及分组 Jurkat T细胞用细胞培养基(RPMI 1640 +10% FBS)在37℃、5%二氧化碳培养箱中培养,每2~3天更换1次新鲜的细胞培养基。取对数生长期细胞制成细胞悬液,用细胞计数仪计数,以 5×10^6 个/mL细胞密度接种于6孔板,设置空白对照组(Control组)、穿心莲内酯组(Andro组)、LY294002组(LY294002为PI3K抑制剂)、穿心莲内酯联合LY294002组(Andro联合LY294002组)。空白对照组不加任何干预,穿心莲内酯组在细胞培养基中添加60 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯,LY294002组在细胞培养基中添加40 $\mu\text{mol/L}$ LY294002抑制剂,穿心莲内酯联合LY294002组在细胞培养基中添加60 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯和40 $\mu\text{mol/L}$ LY294002抑制剂。293T细胞用细胞培养基(DMEM+10%FBS+1%双抗)在37℃、5%二氧化碳培养箱中培养,每2~3天更换1次新鲜的细胞培养基。

1.3.2 WST-1检测不同浓度穿心莲内酯干预后对细胞活性的影响 将Jurkat T细胞按每孔10 000个/mL细胞密度接种到96孔板,设置不同浓度的穿心莲内酯干预细胞,浓度分别是0、20、40、60、80和100 $\mu\text{mol/L}$,处理24 h后,用WST-1试剂盒检测细胞活性,每孔加入10 μL WST-1试剂,在培养箱中孵育2 h,在酶标仪450 nm处测定光密度(optical density, OD)值。计算公式为:细胞存活率(%) = $[(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-

time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测PI3K、Akt mRNA相对表达量 分别收集各组细胞,用PBS洗涤细胞2遍,12 000 r/min离心5 min,收集细胞沉淀,按细胞总RNA提取试剂盒说明书步骤提取细胞总RNA,用分光光度计测各组细胞总RNA的浓度,采用qRT-PCR检测PI3K、Akt mRNA相对表达量。PI3K正向引物:5'-CAACCTTATTATTACCCTCC-3',PI3K反向引物:5'-AGTCTTGTGCGAAAGTCC-3'; Akt正向引物:5'-TCAACAACCTTCTCTGTGGCG-3',Akt反向引物:5'-ATCTCCTCCTCCTCCTGCTT-3'; GAPDH正向引物:5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3',GAPDH反向引物:5'-GTCATGAGTCCTTCCACGATACC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PI3K、Akt mRNA相对表达量。

1.3.4 Western blotting检测p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白相对表达量 分别收集各组细胞,用PBS洗涤细胞2遍,12 000 r/min离心5 min,收集细胞沉淀,于冰上加裂解液裂解细胞,裂解30 min,置于低温离心机中,4℃,12 000 r/min离心10 min。收集上清液,用BCA蛋白定量测定试剂盒检测蛋白浓度,加入5 \times 蛋白上样缓冲液进行蛋白变性。10% SDS-PAGE凝胶电泳,湿转转膜,5% BSA封闭液封闭2 h,洗涤后加入兔抗人PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt一抗(1:1 000)、兔抗人GAPDH一抗(1:5 000)孵育4℃过夜,加入山羊抗兔IgG二抗(1:5 000)常温孵育2 h,最后使用ECL法曝光,用Image J软件分析蛋白条带。

1.3.5 质粒共转染及质粒比例优化 将293T细胞按 1×10^5 个/mL细胞密度接种到12孔板,按细胞常规培养条件在细胞培养箱培养,待细胞生长汇合度达70%~80%时,将HIV骨架质粒pNL4-3-Luc-R-E-和包膜质粒Env用Lipofectamine 3000转染试剂共转染293T细胞,进行HIV假病毒包装。HIV骨架质粒pNL4-3-Luc-R-E-和包膜质粒Env的转染比例为分别为1:0、1:1、1:2、1:3、1:4和1:5。分别于24和48 h收集上清,将二者混合,即为假病毒原液。纯化收集到的病毒上清液,3 500 r/min离心10 min,弃去沉淀,收集上清液并浓缩。通过萤光素酶系统试剂盒来检测假病毒的包装效率。

1.3.6 HIV假病毒制备 按1:1将HIV骨架质粒pNL4-3-Luc-R-E-和包膜质粒Env共转染293T细胞,具体实验步骤同1.3.5,然后抽取一部分上清液检测假病毒的感染能力,置于-80℃冰箱冷冻保存备用。用细胞培养基稀释假病毒,共稀释6个浓

度梯度(5倍、10倍、20倍、40倍、80倍、160倍), 分别感染细胞, 用萤光素酶系统试剂盒检测荧光值, 选出细胞感染后荧光值在 5~40 万间的假病毒溶液浓度进行后续 HIV 假病毒感染实验。

1.3.7 HIV 假病毒感染实验 按 1×10^5 个/mL 细胞密度接种到 96 孔板。用细胞培养基稀释 HIV 假病毒, 每孔加入 100 μL 假病毒稀释液, 混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中培养。假病毒感染 48 h 后向各孔中加入 100 μL 的萤光素酶系统检测试剂, 混合均匀, 在多功能微孔板读数仪上检测各组荧光值。抑制率的计算公式为: 抑制率(%) = $(1 - \frac{\text{荧光值}_{\text{实验孔}}}{\text{荧光值}_{\text{对照孔}}}) \times 100\%$ 。

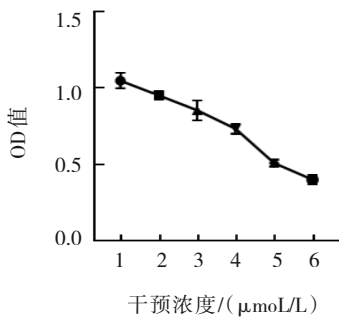
1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 9.4 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组独立样本比较用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 穿心莲内酯对 Jurkat T 细胞活性的影响

不同浓度(0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)穿心莲内酯干预 Jurkat T 细胞 24 h 后的 OD 值分别为(1.05 \pm 0.05)、(0.95 \pm 0.03)、(0.86 \pm 0.07)、(0.73 \pm 0.03)(0.51 \pm 0.02)和(0.40 \pm 0.03), 经方差分析, 差异有统计学意义($F=187.346, P=0.000$)。见图 1。

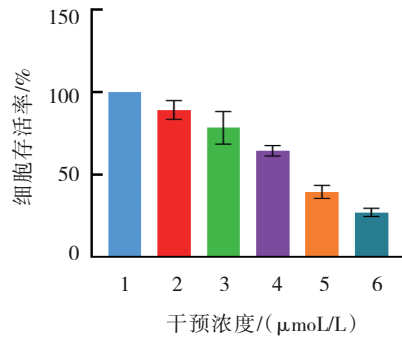


1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$; 4: 60 $\mu\text{mol/L}$; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 1 穿心莲内酯干预 24 h 后 Jurkat T 细胞生长曲线

不同浓度(0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)穿心莲内酯干预 Jurkat T 细胞 24 h 后的细胞存活率分别为(100.00 \pm 0.00)%、(89.38 \pm 5.71)%、(78.55 \pm 9.90)%、(64.65 \pm 3.15)%、(39.74 \pm 3.97)%和(27.27 \pm 2.47)%,

经方差分析, 差异有统计学意义($F=149.403, P=0.000$)。见图 2。



1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$; 3: 40 $\mu\text{mol/L}$; 4: 60 $\mu\text{mol/L}$; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 2 穿心莲内酯干预 24 h 后 Jurkat T 细胞存活率

2.2 穿心莲内酯对细胞内 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平的影响

Control 组、Andro 组、LY294002 组、Andro 联合 LY294002 组的 PI3K、Akt mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Control 组比较, Andro 组、LY294002 组、Andro 联合 LY294002 组的 PI3K、Akt mRNA 相对表达量下降($P < 0.05$); 与 Andro 组、LY294002 组比较, Andro 联合 LY294002 组的 PI3K、Akt mRNA 相对表达量下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞 PI3K、Akt mRNA 相对表达量的比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K mRNA	Akt mRNA
Control 组	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.14
Andro 组	0.59 \pm 0.08 ^①	0.63 \pm 0.06 ^①
LY294002 组	0.61 \pm 0.10 ^①	0.65 \pm 0.06 ^①
Andro 联合 LY294002 组	0.35 \pm 0.08 ^{①②③}	0.38 \pm 0.07 ^{①②③}
F 值	27.792	25.821
P 值	0.000	0.000

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 Andro 组比较, $P < 0.05$; ③与 LY294002 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 穿心莲内酯对细胞内 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响

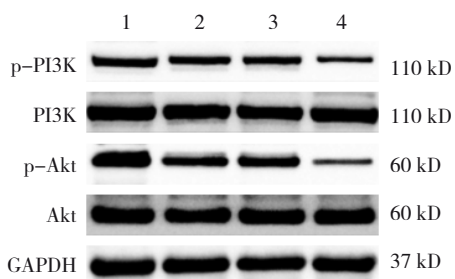
Control 组、Andro 组、LY294002 组、Andro 联合 LY294002 组的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Control 组比较, Andro 组、LY294002 组、Andro 联合 LY294002 组的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋

白相对表达量下降($P < 0.05$);与 Andro 组、LY294002 组比较, Andro 联合 LY294002 组的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量下降($P < 0.05$)。见表 2 和图 3。

表 2 各组细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K 蛋白	p-Akt/Akt 蛋白
Control 组	1.18 ± 0.15	1.00 ± 0.06
Andro 组	0.77 ± 0.12 ^①	0.65 ± 0.07 ^①
LY294002 组	0.71 ± 0.12 ^①	0.69 ± 0.09 ^①
Andro 联合 LY294002 组	0.33 ± 0.05 ^{①②③}	0.33 ± 0.06 ^{①②③}
F 值	26.099	48.835
P 值	0.000	0.000

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 Andro 组比较, $P < 0.05$; ③与 LY294002 组比较, $P < 0.05$ 。



1: Control 组; 2: Andro 组; 3: LY294002 组; 4: Andro 联合 LY294002 组。

图 3 各组细胞蛋白 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、GAPDH 蛋白表达

2.4 共转染质粒比例优化结果

将 HIV 骨架质粒 pNL4-3-Luc-R-E-和包膜质粒 Env 分别按 1:0、1:1、1:2、1:3、1:4 和 1:5 的比例转染, 各组荧光值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。1:1 转染时制备的 HIV 假病毒感染细胞时的萤光素酶基因活性值较高($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 穿心莲内酯对 HIV 假病毒感染细胞的影响

Control 组、Andro 组、LY294002 组、Andro 联合 LY294002 组的 HIV 假病毒抑制率分别为 (0.00 ± 0.00)%、(36.82 ± 1.70)%、与 (27.05 ± 1.43)%、(53.11 ± 0.08)%、各组抑制率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($F = 1205.019, P = 0.000$)。与 Control 组比较, Andro 组、LY294002 组、Andro 联合 LY294002 组的 HIV 假病毒抑制率上升($P < 0.05$)。与 Andro 组、LY294002 组比较, Andro 联合 LY294002 组的 HIV 假病毒抑制率上升($P < 0.05$)。

表 3 不同质粒共转染比例的萤光素酶基因活性值比较 ($\bar{x} \pm s$)

质粒共转染比例	荧光值
1:0	2 011.40 ± 218.50
1:1	53 895.20 ± 2 825.92
1:2	49 801.60 ± 2 682.41
1:3	25 791.20 ± 1 472.38
1:4	15 653.80 ± 1 793.03
1:5	7 892.40 ± 316.87
F 值	682.187
P 值	0.000

3 讨论

几千年来, 中医作为一种医学体系一直是中国的一种医疗保健形式。研究表明, 中医药可以减少抗逆转录病毒治疗的副作用, 改善不良的临床症状, 调节免疫系统功能, 延长患者寿命, 是治疗艾滋病有效和安全的中药^[13]。许多中草药的有效活性成分也已被发现具有很大的抗 HIV 潜能。研究发现, 中草药穿心莲的有效活性成分穿心莲内酯具有潜在的抗 HIV 作用^[14-16]。随着国内外研究的不断深入, 穿心莲内酯被认为是一种多靶点药物, 其通过调控不同的信号通路来对各种细胞的代谢产生影响^[4]。在抗病毒方面, 穿心莲内酯有很大的潜力, 对许多不同的病毒具有抗病毒活性, 包括 HIV、乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、丙型肝炎病毒、基孔肯雅病毒、EB 病毒、人乳头瘤病毒、登革热病毒等^[17]。ENMOZHI 等^[18]对穿心莲内酯进行分子对接、靶点分析、毒性预测和 ADME 预测等计算机研究方法, 对穿心莲内酯作为 SARS-COV-2 主要蛋白酶(Mpro)的潜在抑制剂进行了研究, 发现穿心莲内酯成功对接在 SARS-CoV-2 Mpro 的结合位点。另外, BANERJEE 等^[19]预测穿心莲内酯与褪黑激素的联合疗法可能对抗新型冠状病毒感染具有潜在的实用性。

另一方面, PI3K/Akt 信号通路不仅在肿瘤相关疾病中具有重要角色, 在艾滋病相关研究中也极其重要, 许多基础研究已发现了 PI3K/Akt 信号通路与艾滋病的各种联系^[20-23]。艾滋病发病的第一步是病毒进入细胞, 暴露在 HIV 包膜表面的糖蛋白 gp120 可以激活 PI3K, 使其下游 Akt 活化, PI3K/Akt 通路的

激活有利于病毒通过丝切蛋白 (cofilin) 进入靶细胞^[24]。细胞黏附已被证明可以激活 PI3K/Akt 信号通路, 这种细胞表面接触诱导的 PI3K/Akt 途径的激活也存在于 T 细胞的细胞间接触中, 这是病毒在体内传播的主要模式^[25]。TITANJI 等^[25]研究报道, 蛋白酶抑制剂比逆转录酶抑制剂更有效地防止 T 细胞中的细胞间转移, 而蛋白酶抑制剂已被证明可以减少 Akt 活化^[8]。DING 等^[26]研究发现, PI3K 抑制剂可阻断 HIV 感染细胞。HAMADA 等^[27]研究发现, PIK-75 (PI3K 特异性抑制剂) 可通过 HIV-1 env-CD4 间相互作用, 特别是通过抑制 PI3K/Akt/PTEN 信号通路来阻断细胞与细胞之间的融合, 从而阻止 HIV-1 进入靶细胞。

本研究评估了穿心莲内酯干预通过抑制 PI3K 对 Akt 活化的调控作用及其对 HIV 假病毒感染 Jurkat T 细胞概率的影响。本研究中的 WST-1 实验结果表明, 穿心莲内酯对 Jurkat T 细胞的活性有抑制作用, 因此需根据该实验的结果数据计算 IC₅₀ 值, 以得知 Jurkat T 细胞对穿心莲内酯的耐受程度。经分析 WST-1 实验的数据可知, 穿心莲内酯干预 Jurkat T 细胞的 IC₅₀ 值为 69.78 $\mu\text{mol/L}$, 结合细胞存活率的数据分析, 后续实验中将以 60 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度值来干预 Jurkat T 细胞。为了更好地研究穿心莲内酯通过 PI3K 对 Akt 活化的调节作用, 实验设计了 LY294002 组和穿心莲内酯联合 LY294002 组, 其中 LY294002 抑制剂是 PI3K 抑制剂, 可以通透细胞, 抑制 Akt 磷酸化。通过与有抑制 PI3K 作用的 LY294002 抑制剂对比, 评估穿心莲内酯通过抑制细胞 PI3K 对 Akt 激活的抑制程度。一般而言, 对 Akt 活化的抑制主要是通过抑制 Akt 的上游 PI3K 而实现的。本研究结果显示, 在穿心莲内酯干预后, 细胞的 PI3K、Akt 的基因表达水平及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 的蛋白相对表达量均有下降, 组间比较也显示穿心莲内酯联合 LY294002 抑制剂组的下降趋势更明显, 呈现出协同作用。

为更好地研究穿心莲内酯通过抑制 Akt 的激活影响 HIV 感染 T 细胞的效率这个问题, 实验设计了制备 HIV 假病毒来分别感染各组细胞。HIV 假病毒是相对于 HIV 真病毒比较安全的病毒, 其缺失 HIV 真病毒关键的致病基因, 且只能感染一个周期, 没有自主复制能力, 是筛选抗艾滋病药物的一种常用

的工具。HIV 假病毒感染实验结果显示, 经过穿心莲内酯和 LY294002 抑制剂的干预, HIV 假病毒感染 Jurkat T 细胞的效率下降, 两者联合干预时, 对 HIV 假病毒感染效率的抑制作用更为明显。综合前人的研究结果可知, Akt 的激活通过调节细胞运动, 可能有利于病毒通过细胞间接触传播。结合本研究实验结果可以推测, 穿心莲内酯可能是通过对 PI3K 的抑制, 进而抑制其下游 Akt 的激活, 阻止了 HIV-1 env-CD4 相互作用引起的细胞间融合, 阻碍 HIV 假病毒在 Jurkat T 细胞间接触的传播, 从而降低了假病毒感染 Jurkat T 细胞的效率。在此基础上, 后续研究可从 Akt 的激活与病毒包膜蛋白和细胞表面受体结合介导病毒进入细胞的关系等方面进一步研究。

综上所述, 穿心莲内酯可能通过 PI3K 抑制 Akt 的激活阻碍了 HIV 假病毒的融合和进入 Jurkat T 细胞, 对假病毒感染 Jurkat T 细胞的效率有明显的干预作用, 本研究为进一步研究穿心莲内酯干预 HIV 感染过程的相关作用靶点提供了研究方向, 揭示其未来可能在艾滋病的临床治疗上有更大的应用价值。

参 考 文 献 :

- [1] BBOSA N, KALEEBU P, SSEMWANGA D. HIV subtype diversity worldwide[J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2019, 14(3): 153-160.
- [2] BEYRER C. A pandemic anniversary: 40 years of HIV/AIDS[J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2142-2143.
- [3] WU Z Y, CHEN J F, SCOTT S R, et al. History of the HIV epidemic in China[J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2019, 16(6): 458-466.
- [4] BURGOS R A, ALARCÓN P, QUIROGA J, et al. Andrographolide, an anti-inflammatory multitarget drug: all roads lead to cellular metabolism[J]. *Molecules*, 2020, 26(1): 5.
- [5] HOSSAIN S, URBI Z, KARUNIAWATI H, et al. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) wall. ex nees: an updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(4): 348.
- [6] MBONYE U, LESKOV K, SHUKLA M, et al. Biogenesis of P-TEFb in CD4⁺ T cells to reverse HIV latency is mediated by protein kinase C (PKC)-independent signaling pathways[J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(9): e1009581.
- [7] BARCLAY R A, MENSAH G A, COWEN M, et al. Extracellular vesicle activation of latent HIV-1 is driven by EV-associated c-Src and cellular SRC-1 via the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Viruses*, 2020, 12(6): 665.
- [8] PASQUEREAU S, HERBEIN G. CounterAKTing HIV: toward a "block and clear" strategy[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022,

- 12: 827717.
- [9] 范羿, 周宇, 高伟, 等. 穿心莲内酯通过抑制 PI3K/AKT 通路对人肝癌 HEPG2 细胞凋亡的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2020, 26(6): 496-500.
- [10] ZHANG Q, HU L Q, LI H Q, et al. Beneficial effects of andrographolide in a rat model of autoimmune myocarditis and its effects on PI3K/Akt pathway[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2019, 23(2): 103-111.
- [11] HUANG H K, LU Q P, YUAN X H, et al. Andrographolide inhibits the growth of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 365: 110068.
- [12] XUAN L, HU J H, BI R, et al. Andrographolide inhibits proliferation and promotes apoptosis in bladder cancer cells by interfering with NF- κ B and PI3K/AKT signaling in vitro and in vivo[J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(4): 349-356.
- [13] ZOU W, WANG J, LIU Y. Effect of traditional Chinese medicine for treating human immunodeficiency virus infections and acquired immune deficiency syndrome: Boosting immune and alleviating symptoms[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(1): 3-8.
- [14] KUMAR S, SINGH B, BAJPAI V. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) nees: traditional uses, phytochemistry, pharmacological properties and quality control/ quality assurance[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114054.
- [15] DENG Y Y, BI R, GUO H R, et al. Andrographolide enhances TRAIL-induced apoptosis via p53-mediated death receptors up-regulation and suppression of the NF- κ B pathway in bladder cancer cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(3): 688-700.
- [16] VALDIANI A, TALEI D, LATTOO S K, et al. Genoproteomics-assisted improvement of *Andrographis paniculata*: toward a promising molecular and conventional breeding platform for autogamous plants affecting the pharmaceutical industry[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(6): 803-816.
- [17] GUPTA S, MISHRA K P, GANJU L. Broad-spectrum antiviral properties of andrographolide[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(3): 611-623.
- [18] ENMOZHI S K, RAJA K, SEBASTINE I, et al. Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an in silico approach[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, 39(9): 3092-3098.
- [19] BANERJEE A, CZINN S J, REITER R J, et al. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and anti-viral activities: a novel therapeutic target for COVID-19[J]. *Life Sci*, 2020, 255: 117842.
- [20] DHAMANAGE A S, THAKAR M R, PARANJAPE R S. HIV-1-mediated suppression of IFN- α production is associated with inhibition of IRF-7 translocation and PI3K/Akt pathway in plasmacytoid dendritic cells[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2019, 35(1): 40-48.
- [21] CHANDRA P K, GERLACH S L, WU C X, et al. Mesenchymal stem cells are attracted to latent HIV-1-infected cells and enable virus reactivation via a non-canonical PI3K-NF- κ B signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14702.
- [22] van MONTFORT T, van der SLUIS R, DARCIS G, et al. Dendritic cells potently purge latent HIV-1 beyond TCR-stimulation, activating the PI3K-Akt-mTOR pathway[J]. *EBio Medicine*, 2019, 42: 97-108.
- [23] JEONG J J, KIM D H. 5, 7-dihydroxy-6-methoxy-flavonoids eliminate HIV-1 D3-transfected cytoprotective macrophages by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2015, 29(9): 1355-1365.
- [24] NISHITA M, WANG Y, TOMIZAWA C, et al. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 7193-7198.
- [25] TITANJI B K, AASA-CHAPMAN M, PILLAY D, et al. Protease inhibitors effectively block cell-to-cell spread of HIV-1 between T cells[J]. *Retrovirology*, 2013, 10: 161.
- [26] DING J, CHANG T L. TLR2 activation enhances HIV nuclear import and infection through T cell activation-independent and -dependent pathways[J]. *J Immunol*, 2012, 188(3): 992-1001.
- [27] HAMADA K, MAEDA Y, MIZUTANI A, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase p110 α /PTEN signaling pathway is crucial for HIV-1 entry[J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(1): 130-138.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 张雅靖, 鲁世金, 魏训东, 等. 穿心莲内酯靶向 Akt 信号干预 HIV 感染 T 细胞的效率研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(1): 50-56.

Cite this article as: ZHANG Y J, LU S J, WEI X D, et al. Exploring the efficiency of andrographolide targeting Akt signal to interfere with HIV-infected T cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(1): 50-56.